



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL

VERA KAISSA SOUZA SANTOS BACELAR

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA SURFACTANTE TIPO-B (SP-B) NO PULMÃO DE RATOS SÉPTICOS
TRATADOS COM CEFTRIAXONE E ANTIOXIDANTES**

Recife
2024

VERA KAISSA SOUZA SANTOS BACELAR

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA SURFACTANTE TIPO-B (SP-B) NO PULMÃO DE RATOS SÉPTICOS
TRATADOS COM CEFTRIAXONE E ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, para obtenção do título de Mestre em Saúde Translacional.

Área de concentração: Saúde Humana e Tecnologias Integrativas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Maria Bernadete de Sousa Maia

Coorientador: Prof^º. Dr. Eryvelton de Souza Franco

Recife
2024

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Elaine Freitas, CRB4:1790

B117a Bacelar, Vera Kaissa Souza Santos

Avaliação histopatológica e determinação da expressão da proteína surfactante tipo-b (SP-B) no pulmão de ratos sépticos tratados com ceftriaxone e antioxidantes / Vera Kaissa Souza Santos Bacelar. - 2024.

55 p. : il.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional. Recife, 2024.

Inclui referências e anexos.

1. Proteína surfactante B. 2. Lesão pulmonar aguda. 3. Sepsis. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (orientadora). II. Título.

614

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2024 - 033)

VERA KAISSA SOUZA SANTOS BACELAR

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA SURFACTANTE TIPO-B (SP-B) NO PULMÃO DE RATOS SÉPTICOS
TRATADOS COM CEFTRIAXONE E ANTIOXIDANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

Área de concentração: Saúde Humana e Tecnologias Integrativas

Aprovado em: 30 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a . Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o.Dr. Eryvelton de Souza Franco (Coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. André Martins Galvão (Examinador Externo)
UNINASSAU

Recife
2024

AGRADECIMENTOS

DEUS tem sido bondoso para comigo, pois me levou a lugares que jamais teria por mim mesma condições de chegar.

Aos familiares e amigos que em meio a tantas dificuldades pude encontrar em suas palavras e abraços conforto e força para continuar. Em especial minha mãe Maria Souza, minha irmã Sileide Assis, aos meus amigos Layana Fonseca e Edvaldo Fonseca.

Ao meu querido irmão Kleber Paulo (*in memoriam*) , meu incentivador e exemplo.

Ao meu esposo Marcos Kallyl Bacelar, por acompanhar e apoiar durante todo o processo conferindo-me suporte emocional.

A Dra. Silvania Tavares e Prof.^ª Dra. Paloma L. de Medeiros.
Prof.^ª Dra. Dayane Gomes e a todos do Laboratório de Neuro-endocrinologia e Metabolismo (LNEM) pela prestatividade.

À minha orientadora Prof.^ª Dr. Maria Bernadete, pela confiabilidade e todo suporte para a execução do projeto, bem como as orientações para crescimento pessoal e profissional.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eryvelton Franco, pela disponibilidade durante todo processo e pela diversidade de conhecimento passado.

A todos, meus sinceros votos de agradecimento!

“Portanto, quer comais quer bebais, ou façais, qualquer outra coisa, fazei tudo para glória de Deus.” (Bíblia, 2023, p.1076).

RESUMO

A sepse é um conjunto de manifestações decorrente de infecções que acometem o organismo, sendo potencialmente fatal ou que pode desencadear o surgimento da lesão pulmonar aguda (LPA), visto que os pulmões são um dos órgãos mais comumente atingindo. Avaliar histomorfometricamente e determinar a expressão da proteína surfactante tipo-b (SP-B) nos pulmões de ratos *Wistar* sépticos tratados com ceftriaxone e/ou antioxidantes. Foram utilizados 42 ratos *Wistar* machos (200-350g), para compor sete grupos experimentais (n=6/grupo). Desses, 24 foram submetidos a CLP e tratados com: I) ceftriaxona (30 mg/kg) - ATB; II) Vit C 50mg/kg + NAC 10mg/kg + Vit E 20mg/kg - ATO; III) ATO+ATB; IV) CLP (água para injeção 5 ml/kg). O grupo SHAM (controle) foi composto por três grupos (n=6/grupo), que passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico sem a indução de sepse e foram tratados da mesma forma que CLP: I) SHAM; II) SHAM+ATB; III) SHAM+ATB+ATO. Decorrido 24h do procedimento, os animais receberam o tratamento durante cinco dias consecutivos. Durante esse período os animais foram observados quanto as características fisiológicas e ao final foram anestesiados para determinar o perfil hematológico, e posteriormente coleta do lóbulo pulmonar para avaliação histológica, histomorfométrica e expressão da proteína SP-B por *Western Blot*. O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA-UFPE nº 23076.027592/2017-85. O percentual de mortalidade experimental nos grupos séptico foi de 21,42% o que permitiu estruturar grupos de n=6/grupo. O índice de sobrevivência dos grupos sépticos (CLP) variaram significativamente ($p < 0,05$) de acordo com o tipo de tratamento e o tempo, onde em 48h o grupo tratado com antibiótico obteve maior índice de mortalidade (34%). Quanto as condições fisiológicas observadas (mobilidade, letargia e diarreia) e perfil hematológico, os tratados com ATO ou ATB+ATO não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao SHAM. Na histologia e morfometria, constatou-se que os grupos tratados com ATO+ATB ou ATO isoladamente apresentaram melhores resultados quanto a preservação do parênquima pulmonar, verificando septos delicados, maior quantidade de pneumócitos tipo II e menor infiltração de células inflamatórias. Não foi verificada diferença significativa nestes tratamentos ao se comparar com o grupo SHAM referente a quantidade de macrófago, linfócitos, neutrófilos, pneumócitos e na espessura de septos. A quantificação de SP-B apresentou-se significativamente aumentada no grupo CLP comparado aos demais

grupos. Por sua vez, a expressão de SP-B nos grupos tratados com ATO, ATB ou associação dos dois mostraram-se semelhante àquela verificada no grupo SHAM. Os protocolos que continham antioxidante direcionados ao tratamento da lesão pulmonar aguda, decorrente da sepse, foram mais eficazes e verificou-se que a SP-B quando quantificada na fase aguda da lesão, pode ser um importante marcador da progressão da doença.

Palavras-chave: proteína surfactante B; lesão pulmonar aguda; sepse.

ABSTRACT

Sepsis is a set of manifestations resulting from infections that affect the body, being potentially fatal or which can trigger the emergence of acute lung injury (ALI), since the lungs are one of the most commonly affected organs. To evaluate histomorphometrically and determine the expression of surfactant protein type-b (SP-B) in the lungs of septic Wistar rats treated with ceftriaxone and/or antioxidants. 42 male Wistar rats (200-350g) were used to form seven experimental groups (n=6/group). Of these, 24 underwent CLP and treated with: I) ceftriaxone (30 mg/kg) - ATB; II) Vit C 50mg/kg + NAC 10mg/kg + Vit E 20mg/kg - ATO; III) ATO+ATB; IV) CLP (water for injection 5 ml/kg). The SHAM group (control) was composed of three groups (n=6/group), which underwent the same surgical procedure without inducing sepsis and were treated in the same way as CLP: I) SHAM; II) SHAM+ATB; III) SHAM+ATB+ATO. After 24 hours of the procedure, the animals received the treatment for five consecutive days. During this period, the animals were observed for physiological characteristics and at the end they were anesthetized to determine the hematological profile, and subsequently the lung lobe was collected for histological, histomorphometric and SP-B protein expression evaluation by Western Blot. The experimental protocol was approved by CEUA-UFPE nº 23076.027592/2017-85.

Results: The percentage of experimental mortality in the septic groups was 21.42%, which allowed structuring groups of n=6/group. The survival rate of septic groups (CLP) varied significantly ($p < 0.05$) according to the type of treatment and time, where in 48 hours the group treated with antibiotics had a higher mortality rate (34%). Regarding the physiological conditions observed (mobility, lethargy and diarrhea) and hematological profile, those treated with ATO or ATB+ATO did not show a significant difference ($p < 0.05$) compared to SHAM. In histology and morphometry, it was found that the groups treated with ATO+ATB or ATO alone showed better results in terms of preservation of the lung parenchyma, verifying delicate septa, a greater quantity of type II pneumocytes and less infiltration of inflammatory cells. No significant difference was found in these treatments when compared with the SHAM group regarding the amount of macrophages, lymphocytes, neutrophils, pneumocytes and septal thickness. SP-B quantification was significantly increased in the CLP group compared to the other groups. In turn, the expression of SP-B in the groups treated with ATO, ATB or a combination of the two was similar to that seen in the SHAM group. Protocols

that contained antioxidants aimed at treating acute lung injury resulting from sepsis were more effective and it was found that SP-B, when quantified in the acute phase of injury, can be an important marker of disease progression.

Key words: surfactant protein B; acute lung injury; sepsis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1–	As cinco gerações das cefalosporinas.	25
Figura 2–	Fluxograma representando o desenho experimental do estudo.	30
Figura 3–	Representação ilustrativa do modelo experimental de sepse.	31
Figura 4–	Ilustração do processo para detecção de proteína por <i>Western Blotting</i> .	33
Figura 5–	Ilustração do processamento histológico para obtenção de lâminas.	34
Figura 6–	Sobrevivência de ratos Wistar em modelo de sepse experimental.	36
Figura 7–	Tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> controle (SHAM, Fig. 7A); sépticos sem tratamento (CLP, Fig. 7B); tratados com: antibiótico (ATB, Fig. 7C); associação de vitaminas e antioxidante (ATO, Fig. 7D); associação de antibiótico, vitaminas e antioxidante (ATB+ATO, Fig. 7E).	39
Figura 8–	Quantificação de macrófago (A), neutrófilo (B) e linfócito(C) em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados.	40
Figura 9–	Quantificação de pneumócitos tipo II em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados.	41
Figura10–	Quantificação de alvéolos pulmonares (A) espessura dos septos alveolares (B) e da determinação da área alveolar (C) em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados.	42
Figura11–	Quantificação de proteína surfactante tipo B em pulmão de ratos Wistar hígidos (SHAM) e sépticos (CLP) tratados com antibiótico (ATB), antioxidantes (ATO) ou antibiótico mais antioxidante (ATB+ATO).	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características do comprometimento da condições fisiológicas após 5(cinco) dias de intervenção em ratos Wistar sépticos tratados com: ATB; ATO; ATB+ATO; CLP+AD e SHAM+AD. 37
- Tabela 2** – Parâmetros hematológicos verificados em ratos Wistar controles: SHAM, séptico (CLP) e sépticos tratados com ATO; ATB; ATB+ATO. 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLP	Ligação e Punção Cecal
CEUA	Comissão de Ética para Uso de Animais
FIP	Injeção Intraperitoneal Fecal
H&E	Hematoxilina e Eosina
ILAS	Instituto Latino-Americano de Sepsis
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
NAC	N-acetilcisteína
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
SP-B	Proteína Surfactante B
SP	Surfactante pulmonar
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNF-b	Fator de Necrose Tumoral Beta
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
ATO	Antioxidante
ATB	Antibiótico
ATO+ATB	Antioxidante +Antibiótico
SHAM	Grupo controle

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	SEPSE	17
2.2	FISIOPATOLOGIA DA SEPSE	18
2.3	LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)	20
2.4	SURFACTANTE PULMONAR	21
2.4.1	Surfactante Pulmonar Tipo B	22
2.5	INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA	23
2.5.1	Antibiótico	24
2.5.2	Suplementação com Antioxidantes	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	LOCAL DE ESTUDO	29
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
4.2.1	Tratamento dos Animais	30
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA COM WESTERN BLOT	31
4.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR	32
4.5	MORFOMETRIA	33
4.6	ANÁLISE HEMATOLÓGICAS	34
4.7	SCORE FUNCIONAL	34
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS	36
5.1	QUANTIFICAÇÃO DO INDICIE DE MORTALIDADE DOS ANIMAIS SÉPTICOS	36
5.2	AVALIAÇÃO DA CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS	37
5.3	ANÁLISE HEMATOLÓGICA	37
5.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR	38

5.5	AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO PULMÃO DE RATOS <i>WISTAR</i> SÉPTICOS	39
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
	ANEXO B- SUBMISSÃO DO ARTIGO	

1 INTRODUÇÃO

Segundo Viana *et al.*, (2020), a sepse é intitulada como uma disfunção sistêmica potencialmente fatal, ocasionada por agentes infecciosos bacterianos, virais, fúngicos ou por meio de protozoários. Os focos infecciosos mais comumente relacionados a sepse são o trato respiratório (pulmão), seguido pela região abdominal e trato urinário (Teles, 2022).

Dantas *et al.*, (2020), consideram que a sepse é uma das principais patologias envolvidas no desenvolvimento de Lesão Pulmonar Aguda (LPA), em decorrência da resposta do organismo à entrada de agentes infecciosos, induzindo a liberação de mediadores químicos que disparam o processo inflamatório. Esses efeitos inflamatórios estão relacionados com a redução de surfactante pulmonar, onde sua principal função é reduzir a tensão superficial na interface ar-líquido do interior do alvéolo, facilitando a ventilação. Esta característica única, permite evitar o colapamento alveolar no final da expiração (Ghati *et al.*, 2021).

As proteínas surfactantes são compostas por cerca de 90% de lipídios essenciais para a redução da tensão superficial da interface ar-líquido do pulmão, e cerca de 10% de proteínas com propriedades imunes e tensoativas (Liu *et al.*, 2022). Dentre os surfactantes existentes a proteína surfactante B (SP-B) que é uma pequena proteína hidrofílica, que desempenha papel primordial para a função surfactante pulmonar, sendo sua ausência congênita incompatível com a vida (Pérez-Gil, 2022). As proteínas surfactantes são normalmente encontradas em níveis adequados nos pulmões, no entanto, em distúrbios respiratórios envolvendo lesão no epitélio alveolar e endotélio vascular, a proteína surfactante-B apresenta-se em níveis elevados no plasma e lavado broncoalveolar, autores consideram que este fato esteja atrelado ao agravamento da lesão pulmonar (Andrew *et al.*, 2000; Ian *et al.*, 1997).

O uso de antibióticos de amplo espectro é a base para o tratamento da sepse de origem bacteriana (Da Rosa Steiner, 2022). No entanto, o estresse oxidativo associado ao uso de antibióticos exerce um importante papel na patogênese da sepse. Tornando-se um dos principais alvos terapêuticos, onde a suplementação com antioxidantes tem sido utilizada como adjuvante no tratamento (Wenclewska *et al.*, 2019; Zanza *et al.*, 2019). Porém, se faz necessário uma melhor avaliação dos seus efeitos na sepse. Diante do exposto, o referido trabalho avaliou a resposta da

suplementação com antioxidantes associado ou não ao tratamento com antibiótico quando administrados por via intraperitoneal, frente a expressão de SP-B no pulmão de ratos *Wistar* sépticos induzidos experimentalmente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SEPSE

A sepse é definida como síndrome de resposta inflamatória sistêmica desregulada, devido à presença de agente infeccioso que ocasionam lesões aos órgãos e tecidos, onde ocorre excessiva produção de citocina pró-inflamatória culminando com aumento da permeabilidade capilar, provocando lesão tecidual e morte por falência (Barichello *et al.*, 2022).

A sepse demanda cerca de 24% a 32% dos custos totais de uma UTIs, esta condição se dá devido às internações e tratamentos medicamentosos de alto custo. O diagnóstico tardio resulta em complicações do quadro clínico, prolongando a permanência do paciente no ambiente hospitalar. O custo com pacientes internados na urgência e emergência gira em torno de R\$38.867,60, onde mais da metade deste valor é gasto com pacientes que não sobrevivem a sepse, pois além dos gastos gerados com a internação leva-se em consideração os honorários da equipe multiprofissional, diárias hospitalares, diagnósticos e procedimentos cirúrgicos (Santos *et al.*, 2021).

Diante da gravidade apresentada em pacientes nas unidades de terapia intensiva (UTIs), podendo chegar ao óbito, a sepse tem sido classificada como um problema de saúde pública pelos principais órgãos de monitoramento (Gauer *et al.*, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) 11 milhões de pessoas por ano são vítimas da sepse, no Brasil, calcula-se que cerca de 240 mil óbitos por ano ocorram devido ao conjunto de manifestações desregulada do organismo ocasionada pela infecção com desfecho séptico, onde a COVID-19 corroborou para o aumento desses casos nas unidades hospitalares (Fiocruz, 2021).

Tendo como referência a base de dados de notificações de caso de sepse através do SINAN-DATASUS (Doenças e Agravos de Notificação) em hospitais públicos no Brasil, foram analisadas as notificações realizadas no período de julho de 2018 a abril de 2021, foi encontrado 424.365 notificações relacionadas a sepse no Brasil. A maioria das notificações ocorreram em: São Paulo (24,47%), Minas Gerais (16,72%) e Rio de Janeiro (9%). As maiores taxas de mortalidade foram observadas no Rio de Janeiro (58,20%), Amazonas (56,54%), São Paulo (55,48%), Ceará

(54,64%), Tocantins (54,28%) e Pernambuco (52,01%). A análise da distribuição dos casos realizadas neste período demonstra que a letalidade dos casos de sepse apresentou um aumento de 38,7% em 2018; 44,7% em 2019; 46,8% em 2020 e 46,6% em 2021 (Lima-Junior *et al.*, 2022).

A sepse é um processo de resposta inflamatória sistêmica complexo que envolve alterações na função de múltiplos órgãos do corpo, a nível celular e molecular. Promovendo desequilíbrio na resposta inflamatória, disfunção imune, dano mitocondrial, coagulopatia, anormalidades da rede imune neuroendócrina, estresse do retículo endoplasmático, autofagia e outros processos fisiopatológicos, acarretando a disfunção orgânica (Huang *et al.*, 2019). Sendo uma enfermidade que necessita de uma atenção maior dos órgão/instituições de saúde sejam no desenvolvimento de novas estratégias para a sua prevenção ou para o seu tratamento.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

As vias de sinalizações envolvidas na resposta desregulada do hospedeiro tronam a sepse, uma síndrome heterogênia com grande potencial de risco a vida. A interação entre microrganismos e hospedeiro se inicia pelo reconhecimento das substâncias do agente etiológico através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) fatores exógenos ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) fatores endógenos (Zhang *et al.*, 2021).

A ativação do sistema imune inato ocorre por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais são expressos por células do sistema imune inato. Estas moléculas são transferidas aos receptores CD14 e TLR4 existentes na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos desencadeando uma resposta inflamatória (Huang *et al.*, 2019).

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra infecções, sua função é intermediada por fagocitose, espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte dependente de protease de patógeno ingerido, além do que sua ativação produz óxido nítrico (NO) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) que por sua vez promove inflamação e lesão do tecido na sepse (Denning *et al.*, 2019).

A lesão epitelial alveolar envolve a membrana basal e os pneumócitos tipos I e II. Como consequência a redução da quantidade e alteração da funcionalidade do surfactante, ocorrendo aumento da tensão superficial do alvéolo, atelectasias por colapso, redução da complacência pulmonar, indução da apoptose, necrose e dificuldade da troca gasosa (Kligerman, 2022).

A superfície interna dos alvéolos é composta por 70% de pneumócitos tipo I. O mesmo compartilha uma membrana basal com o endotélio capilar pulmonar criando uma barreira ar-sangue onde ocorre as trocas gasosas, esses pneumócitos se entrelaçam uns aos outros por junções apertadas, formando uma barreira impermeável para limitar a infiltrações de líquidos nos alvéolos, tendo com função, facilitar a troca gasosa, manter o equilíbrio de íons, fluidos dentro dos alvéolos e comunicar-se com os pneumócitos tipo II para secretar surfactante.

Os pneumócitos tipo II compõe 7% dessa superfície interna dos alvéolos, em seu citoplasma possuem corpos lamelares característicos contendo surfactante, substância responsável por reduzir a tensão superficial dos alvéolos, sua principal função é produzir e secretar surfactante, expressar proteínas imunomoduladoras necessárias para a defesa do hospedeiro, movimento trans epitelial da água e regeneração dos epitélios após lesão (Brandt & Mandiga, 2020).

Esta lesão envolve diversos processos inflamatórios, como a liberação de NF- κ B (factor nuclear kappa B) que determina a produção e secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas 1 (IL-1), 2 (IL-2), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e TNF- β (fator de necrose tumoral beta), evento considerado crucial no desenvolvimento de sepse (Nascimento *et al.*, 2019).

A TNF- α juntamente a IL-1 propicia estado pró coagulante, além de ser responsável pela permeabilidade vascular por induzir moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, beneficiando a diapedese de macrófagos e recrutamento de novas células inflamatórias (Calabretta *et al.*, 2021).

Os macrófagos são fagócitos mononucleares residentes nos alvéolos e exerce papel importante no sistema imunológico. Coletam partículas inaladas do ambiente (carvão, sílica dentre outros) bem como microbiano (vírus, bactérias e fungos). Os

receptores *toll-like* em sua superfície, possibilita a interação com receptores moleculares associados ao patógeno, auxiliando na fagocitose de patógenos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias para potencializar a resposta imune local. Sendo assim, responsável pelo recrutamento e ativação de células inflamatórias (Carvalho & Stevenson, 2022; Brandt & Mandiga, 2020).

As vias de sinalização podem ser divididas das seguintes formas: TLR4/TRIF/IRF3 e TLR4/MyD88/NF- κ B. A via TLR4/TRIF/IRF3 envolve a ativação do TRIF, a internalização do complexo TLR4/TRIF dentro dos endossomos com subsequente ativação do fator de transcrição regulador do interferon-3 (IRF3) e produção de interferon. Ao mesmo tempo, a ativação da via TLR4/MyD88/NF- κ B leva à fosforilação de MyD88 e quinases associadas ao receptor de interleucina-1 1 e 4 (IRAK1 e IRAK4). A TNF- α através da ativação de vias inflamatórias, resultam na translocação nuclear do NF- κ B, que por sua vez aumenta a produção de citocinas desencadeiam por consequência a lesão pulmonar aguda (Dolmatova *et al.*, 2021).

2.3 LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)

Dentre os órgãos mais afetados em pacientes sépticos nas UTIs de forma global, a infecção atinge principalmente os pulmões (64%), região abdominal (apendicite, peritonite, biliares e hepáticas) (20%), corrente sanguínea (15%) e trato urinário (14%) (Font *et al.*, 2020). Diante dos conjuntos de manifestações clínicas desencadeadas pela sepse, observa-se o desenvolvimento da Lesão Pulmonar Aguda (LPA) (Bernardo, 2022).

A síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA), termo clínico utilizado para lesão pulmonar aguda (LPA), é um dos parâmetros críticos usados para mortalidade em pacientes com sepse. A LPA é caracterizada pelo aumento da permeabilidade, lesão da membrana alvéolo-capilar, extravasamento de fluido rico em proteínas para o espaço alveolar, produzindo um quadro de edema pulmonar e colapso alveolar, onde os neutrófilos apresentam papel principal, tornando-se ativados liberando mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases que lesionam diretamente o epitélio alveolar e o endotélio vascular, propagando o processo inflamatório (Park *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

Os fatores de riscos da LPA podem ser divididos em fatores diretos e indiretos. Os fatores diretos são caracterizados por infecções pulmonares severas, afogamento, contusão e embolia pulmonar, promovendo lesões alveolares graves. Por sua vez, os fatores indiretos que englobam a sepse são: transfusão, trauma, pancreatite, embolia gordurosa e overdose por substâncias (medicamentos prescritos), onde uma inflamação sistêmica é instalada e este processo gera disfunção endotelial vascular e infiltração de múltiplas células inflamatórias resultando em lesão alveolar (He yq *et al.*, 2021).

Por meio das células alveolares tipo I e II a tensão superficial é reduzida. Os pneumócitos desempenham papel de barreira contra infiltrações, facilita a troca gasosa, além de produzir e secretar surfactante. O tipo II possui organelas chamadas de corpos lamelares, onde os surfactantes são armazenados e são excretadas para o espaço ar-líquido alveolar, mimetizando a tensão superficial, facilitando a respiração. O surfactante pulmonar é uma mistura heterogênea composta por lipídios e proteína, que forma um filme e reveste a interface de transferência entre o alvéolo pulmonar e o ar, evitando o colapso pulmonar (Mirastschijski *et al.*, 2020).

2.4 SURFACTANTE PULMONAR

Surfactante pulmonar (SP) é um fluido composto por lipoproteínas que age reduzindo a tensão superficial, que atua na interface ar-líquido alveolar, onde sua função é estabilizar os alvéolos, evitando seu colapso no final da expiração. O surfactante é composto por lipídeos e proteínas, são sintetizados pelos pneumócitos tipo II (PNM II) e armazenado no citoplasma das células em corpos laminares (estruturas intracelulares) para posteriormente ser secretado no espaço alveolar (Walther *et al.*, 2019).

O surfactante forma uma mielina tubular (monocamada que reveste a superfície alveolar) essencial para a sua organização em uma monocamada lipídica na interface ar-líquido alveolar. Os lipídios correspondem a aproximadamente 80-90% da composição do surfactante, sendo constituídos principalmente por fosfolipídeos, lipídios neutros (colesterol) e insaturados (Varela, 2019). A fosfatidilcolina é o fosfolipídeo mais comum, com predomínio da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). A DPPC é um componente essencial, capaz de reduzir a tensão superficial dos alvéolos.

As proteínas representam cerca de 10% da massa do SP, sendo caracterizadas quatro delas: SP-A, SP-B, SP-C e SP-D (Castillo-Sánchez *et al.*, 2021).

As proteínas SP-A e SP-D são proteínas hidrofílicas que desempenham seu papel principal na defesa imune inata na barreira alveolar, com reconhecimento, ligação e eliminação de patógenos. As proteínas SP-B e SP-C são duas apolipoproteínas altamente hidrofóbicas, são cruciais para a função do surfactante, para a eficiente adsorção das moléculas ativas da superfície, e estabilidade do filme interfacial. O mesmo participa do processo de difusão do DPPC no surfactante ao longo dos ciclos contínuos de respiração de compressão-expansão (Guzmán & Santini 2019; Oliveira, 2020).

A SP-A é a mais abundante proteína do SP, representando 5% da sua massa. Entre as suas funções, destaca-se um importante papel na defesa imune pulmonar. A deficiência de SP-A prejudica a eliminação, tanto de bactérias como de vírus, dos pulmões, facilitando a disseminação de infecções (Gupta *et al.*, 2021). A proteína SP-D é uma proteína hidrossolúvel e, embora não possua atividade de redução na tensão superficial, desempenha um papel na defesa imune do pulmão ao se ligar com vários complexos carboidratos e glicolípídios, interagindo com a superfície de bactérias e outros mecanismos (Pimentel, 2020).

Quanto a SP-C sua deficiência não resulta em morte por insuficiência respiratória, embora possa contribuir para a evolução da doença pulmonar intersticial (Robichaud *et al.*, 2019). A SP-B é uma proteína fundamental para a função do SP, sendo sua ausência congênita incompatível com a vida. Essa proteína possui a função de formar e organizar a mielina tubular no interior do alvéolo, além de facilitar a adsorção da fosfatidilcolina na temperatura fisiológica.

2.4.1 Surfactante Pulmonar Tipo B

O surfactante é uma proteína sintetizada por células alveolares do tipo II. O surfactante B possui como produto primário uma pré-proteína de 381 aminoácidos, que por sua vez passa por várias etapas de processamento proteolítico. O processamento da pré-pró-proteína inclui a clivagem do peptídeo sinal e a glicosilação, produzindo uma pró-proteína de 42 kDa, clivagens proteolíticas do NH 2-

peptídeo terminal (170 aminoácidos), produzindo um intermediário de 25-kDa, clivagem proteolítica do peptídeo COOH-terminal (102 aminoácidos), produzindo um intermediário 9-kDa e clivagem proteolítica do peptídeo N-flanqueador (10 aminoácidos), produzindo um peptídeo maduro biofisicamente ativo de 8-kDa de 79 resíduos (Osanai *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021).

As principais funções do SP-B estão relacionadas com a adsorção de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC) na interface ar-líquido alveolar, formação e organização da mielina tubular no interior do alvéolo e estabilização da camada de surfactante pulmonar na interface ar-líquido (Silva *et al.*, 2021). Durante a expansão pulmonar, os componentes do surfactante migram para a monocamada. Na expiração, a monocamada é comprimida, sendo assim, excluídos as proteínas, os fosfolípidios não-saturados e deixando uma interface enriquecida em DPFC (Johansson & Curstedt, 2019).

A DPFC, por estar no estado sólido a 41-42° C não se espalha naturalmente na interface ar-líquido em temperatura corporal, necessitando da presença de outros fosfolípidios hidrofóbico para a adsorção na monocamada da interface ar-líquido. A SP-B possui temperaturas de 37 °C, sendo essencial à rápida adsorção da DPFC para formar uma monocamada na interface ar-líquido, para que este filme de DPFC apresente uma tensão superficial mínima durante a compressão dinâmica. Por este mecanismo, a monocamada fica rica em DPFC, que é o componente mais importante na diminuição da tensão superficial durante a compressão (Johansson & Curstedt, 2019; Castillo-Sánchez *et al.*, 2021).

2.5 INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

A fim de evitar complicações e progressão do paciente a choque séptico ou falência de múltiplos órgãos é recomendado a administração imediata de antibióticos em pacientes com suspeitas de sepse (Zhou *et al.*, 2019). Na sepse não é desconhecido inicialmente o agente causador patológico, portanto inicia-se de imediato a antibioticoterapia de amplo espectro e baixa toxicidade (Viana *et al.*, 2020) como as cefalosporinas, que por sua vez possui poucos efeitos adversos, toxicidade

e contraindicações ao seu uso, apresentando elevada potência terapêutica bem como posologia atrativa (Werth, 2022; EMS, 2020).

As cefalosporina são subdivididas em gerações, essas subclasses são compostas por cinco gerações (Figura 1), onde cada uma destas possui particularidades em relação ao espectro antimicrobiano, potência e características farmacocinética e farmacodinâmica (Sanar, 2019; EMS, 2020).

Figura 1 – As cinco gerações das cefalosporinas.

CEFALOSPORINAS	
1ª Geração	Cefalotina, cefazolina, Cefalexina, Cefadrocila
2ª Geração	Cefaclor, Cefuroxima
3ª Geração	Ceftriaxone, Cefotaxima, Ceftazidima
4ª Geração	Cefepime, Cefipiroma
5ª Geração	Ceftarolina, Ceftobiprole

Fonte: Autora, 2024.

2.5.1 Antibiótico

A Ceftriaxona pertence a terceira geração da cefalosporina, sendo uma droga que age inibindo a síntese da parede microbiana, possuindo amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas e positivas. Possui meia-vida elevada (intervalo de tempo que a concentração plasmática se reduz a metade), alcançando elevados picos séricos (Duceac *et al.*, 2020). É indicada principalmente no tratamento da sepse, infecções do trato respiratório e urinário, além do tratamento de meningite (Bula, 2020).

Pode ser administrada pela via intravenosa ou intramuscular. A maioria das cefalosporinas de terceira geração são inativadas no estômago, limitando a absorção no duodeno e inviabiliza a administração oral. A ceftriaxona tem a maior meia-vida sérica da classe, variando entre 5 e 10 horas, isso possibilita uma única administração ao dia (Bula, 2020).

Ela possui uma taxa de ligação muito alta às proteínas plasmáticas, cerca de 96%, além disso, como a maioria das cefalosporinas de 3ª geração, ela atinge níveis terapêuticos na maioria dos fluidos e tecidos corporais, incluindo sangue, urina, bile, pulmão. A ceftriaxona é excretada pelos rins e pelo fígado, sendo 40% da medicação excretada na bile (Carteado, 2020).

No entanto, trabalhos relatam que o uso de ceftriaxone eleva os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), marcador final de peroxidação lipídica (MDA) e diminui os níveis de enzimas antioxidantes, desencadeando estresse oxidativo (El-Megharbel *et al.*, 2022). O estresse oxidativo desempenha papel fundamental na patologia da sepse, sendo assim um dos principais alvos terapêuticos (Sulzbacher *et al.*, 2020).

Estudos relatam que a suplementação com antioxidantes associado a antibioticoterapia na sepse tem mostrado resultados satisfatórios tanto em roedores quanto em seres humanos, a ação protetora nos organismos contra espécies reativas pode reduzir a severidades da sepse, estando associada à redução da mortalidade, redução na duração da ventilação mecânica e tendência na redução de infecções (Holford *et al.*, 2020; Ritter *et al.*, 2020).

2.5.2 Suplementação com Antioxidantes

A fisiopatologia da sepse leva ao aumento de substâncias pró-oxidantes, acarretando a redução de antioxidantes endógenos (vitamina C, E, β -caroteno, catalase, e superóxido dismutase) diminuindo sua atividade protetora. Os antioxidantes podem atuar por meio de duas vias, sendo elas enzimáticas e não enzimáticas. A via enzimática, é um sistema composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GSH). A via não enzimática, composta por antioxidantes na sua maioria exógenos, incluem as vitaminas E, C, N-acetil cisteína e outras. Grande parte dos antioxidantes não enzimáticos é encontrada na alimentação e eles podem ser suplementados por meio da dieta (Plocharski *et al.*, 2019; Carvalho, 2021; Miotti, 2021).

A vitamina E é uma expressão global utilizada para intitular oito compostos lipossolúveis, sendo eles: α , β , γ e δ tocoferóis e α , β , γ e δ tocotrienóis. Sendo α -

tocoferol a forma mais conhecida, a mesma previne dano oxidativo celular através da inativação dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS), bem como, possui propriedades na modulação da sinalização celular e transcrição de genes. Por se tratar de composto lipossolúvel e constituir as membranas celulares, a vitamina E torna-se capaz de impedir a deterioração lipídica e por consequência impede a formação de hidroperóxidos. A vitamina E pode servir como antioxidante, anti-inflamatório, anticoagulante e antifibrilante (Sudirman *et al.*, 2022).

O ácido L-ascórbico possui ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anticoagulantes e imunomoduladoras, por estes motivos apresenta ser um forte candidato como adjuvante no tratamento para a sepse. A vitamina C é um importante eliminador de radicais livres, capaz de modificar atividades antimicrobianas, assim como reduzir significativamente os efeitos ocasionados das espécies reativas. As altas concentrações do ácido ascórbico demonstra possuir funções imunomoduladoras, dentre outras propriedades, minimizando o risco de infecção, por sua vez a vitamina C também possui efeitos antimicrobianos, onde foram detectadas ações contra diversos organismos patogênicos incluindo: *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. A vitamina C é crucial para um mecanismo de defesa do hospedeiro (Mumtaz *et al.*, 2022).

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto de tiol (contendo sulfidril) com um potente efeito antioxidante e como fonte de grupos sulfidril nas células, é amplamente usado na clínica médica. A NAC possui ação de 23 antioxidante diretamente, através dos seus radicais de tiol, e indiretamente, pela reposição de estoques celulares diminuídos de glutathione. Diante disto pode-se inferir que a NAC age diretamente no controle dos radicais livres mediante interação com o radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, e indiretamente mediante a indução da síntese de glutathione, cuja principal função é a remoção de radicais livres e defesa contra o estresse oxidativo (Silva, 2021).

Estudos experimentais em animais, foram realizados a fim de estabelecer a eficácia da vitamina C e E frente a sepse. Os resultados demonstraram que os grupos que receberam administração de vitamina E e C apresentavam menores níveis plasmáticos de TNF- α , PCR, IL 1- β , IL-6 e MDA em relação ao grupo séptico sem tratamento. Desta forma os autores concluem que os animais tratados com a

suplementação de vitaminas (E e C) apresentam resultados positivos na sepse, podendo ser utilizada como terapia adjuvante para pacientes sépticos por sua eficácia e custo-benefício (Nur *et al.*, 2022).

Holford *et al.*, (2020), relata dados de pacientes hospitalizados acometidos por infecção, sepse e COVID-19 apresentavam níveis indetectáveis de vitamina C em comparação com controle saudáveis. Segundo o mesmo, a vitamina C colabora com a regulação negativa das citocinas preservando o endotélio de lesões oxidativas, além de deprimir espécies reativas de oxigênio (EROS) e a inflamações através da ativação do NF- κ B (Ammar *et al.*, 2021).

Estudos realizados através de bioinformáticas comprovam potenciais alvos terapêuticos da vitamina c, que apresenta ação farmacológica contra a sepse, podendo ser avaliadas em estudos pré-clínico antes de serem implementados no tratamento clínico de pacientes sépticos (Li *et al.*, 2021).

May *et al.*, (2021), relata em seu estudo dados que sustentam a utilização de megadose da vitamina C como tratamento de pacientes acometidos por sepse e COVID-19. A administração via intravenosa de ácido ascórbico (150g por 40kg ao longo de 07:00 horas) demonstrou melhora no estado clínico nas funções cardiovasculares, pulmonar, hepática e renal, bem como reduziu a temperatura corporal, em modelo ovino clinicamente relevante de sepse induzida por bactérias Gram-negativas. Nos pacientes com COVID-19 a vitamina C intravenoso (60g) restabeleceu a pressão arterial, melhorou a função renal e aumentou os níveis de oxigênio no sangue arterial.

Assim como a vitamina C outros antioxidantes possuem estudos referente a sua ação protetora na sepse. Ritter *et al.*, (2020), descreve seu experimento em ratos wistar onde a administração de N-acetilcisteína (NAC) mais a desferroxamina (DFX) aumenta a sobrevida no modelo de CLP (Ligação e punção cecal), isto após três horas da indução da sepse, sendo observado menor dano oxidativo. Concluindo que a mesma foi capaz de aumentar a sobrevida dos animais, apresentando ser uma forte candidata a ser implementada como droga complementar no tratamento da sepse. A utilização dos antioxidantes para mimetizar a ação oxidantes no organismo já é bem fundamentado, sendo assim um potente adjuvante no tratamento preconizado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar histopatologicamente e determinar da expressão da proteína surfactante tipo-B (SP-B) no pulmão de ratos sépticos tratados com ceftriaxona e antioxidantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o índice de mortalidade entre os animais SHAM e CLP tratados ou não com ceftriaxona ou antioxidante;
- Avaliar características fisiológicas (piloereção, trânsito intestinal, letargia e mobilidade) dos ratos *Wistar* com sepse;
- Determinar o perfil hematológico desses animais sépticos;
- Analisar histologicamente e morfometricamente as estruturas pulmonares;
- Identificar e quantificar a expressão da SP-B por Western Blotting em tecido pulmonar de ratos *Wistar* com sepse.

4 METODOLOGIA

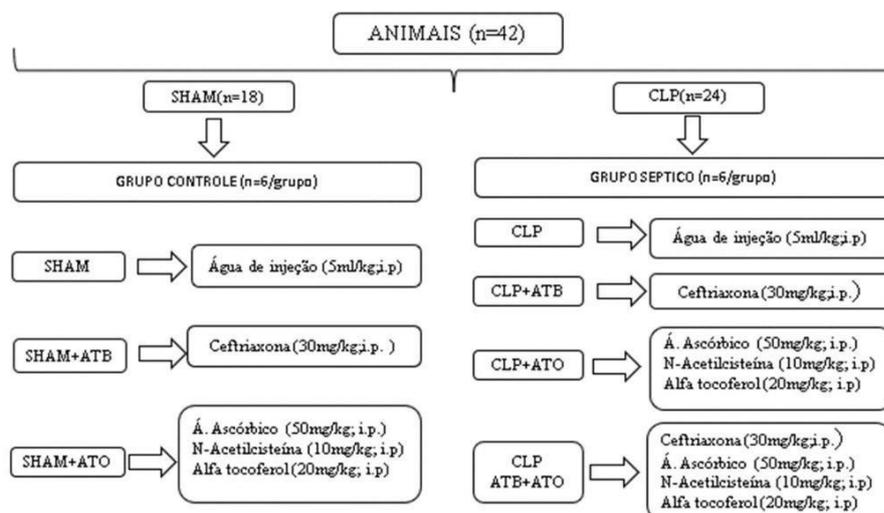
4.1 LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos (LFPB) em parceria com o Laboratório de Neurofisiologia e Metabolismo (LNEM) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia localizados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no *campus* Recife.

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 42 ratos *Wistar* machos (200-350g) para compor sete grupos experimentais (n=6/grupo), provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Biociências da UFPE. Todos os animais passaram por um período de adaptação de 24h, e foram mantidos em condições padrões (temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com controle de ciclo claro/escuro), com acesso à ração comercial e à água *ad libitum*, antes dos experimentos. Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Ética em Experimentação Animal, COBEA, e com a aprovação pelo Comitê de Ética do Centro de Biociências da UFPE sob o n°23076.027592/2017-85. Inicialmente, os animais foram aleatoriamente divididos em sete grupos experimentais (n=6 animais/grupo) tratados conforme descrito a seguir (Figura 2):

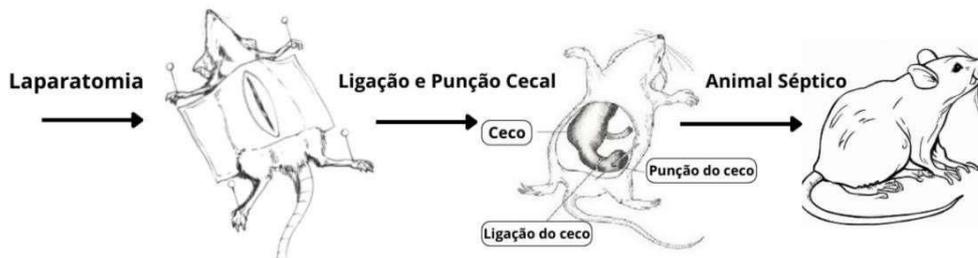
Figura 2 – Fluxograma representando o desenho experimental do estudo.



Fonte: Autora, 2024.

Para minimizar a variabilidade entre os diferentes experimentos, o procedimento de indução de sepse foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador. Os animais dos grupos CLP, CLP+ATB, CLP+ATO OU CLP+ATB+ATO foram submetidos ao modelo experimental de sepse, pela punção, ligadura e perfuração do cécum. Para tanto, sob condições assépticas, e anestesia, (Cetamina e Xilazina, 100mg/kg e 15mg/kg, respetivamente), uma linha média de 3-centímetros, realizou-se laparotomia, para permitir a exposição do cécum. O ceco foi firmemente ligado com uma linha de sutura de seda 3,0 na sua base, abaixo da válvula ileocecal, e perfurado com uma agulha de 14 gauge. Comprimiu-se então suavemente o ceco, para expor uma pequena quantidade de fezes a partir do local de perfuração. Uma operação simulada (laparotomia e exposição cecal, sem qualquer outra manipulação) foi realizada nos animais dos grupos SHAM, SHAM +ATB e SHAM+ATO (Figura 3).

Figura 3 – Representação ilustrativa do modelo experimental de sepse



Fonte: Autora, 2024.

4.2.1 Tratamento dos Animais

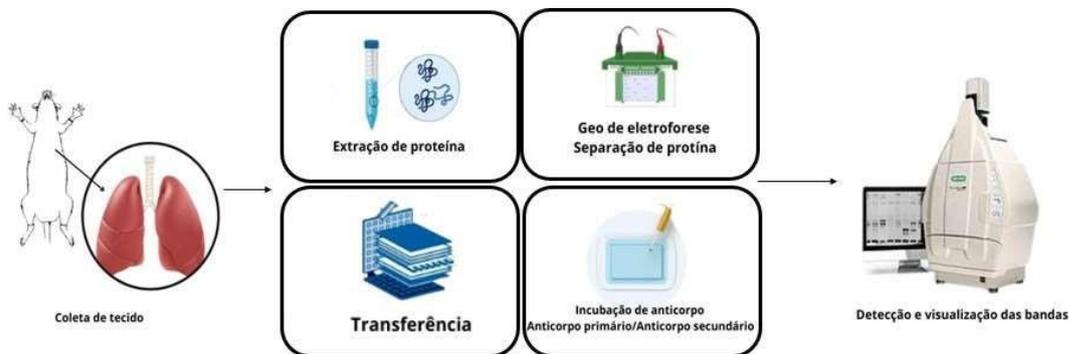
Todos os animais foram observados, para determinar os sinais de infecção (tais como, piloereção, letargia, diarreia e perda de peso). 24h após o procedimento cirúrgico, os animais foram tratados durante cinco dias consecutivos de acordo com seus respectivos grupos. Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta do tecido pulmonar. A sobrevivência foi registrada durante um período de 5 dias.

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA COM WESTERN BLOT

Doze horas após o último procedimento experimental, os animais foram anestesiados. Em seguida, foram tricotomizados na região do tórax e realizada a dissecação para exposição do pulmão. O tecido excisado (pulmão) foram pesado, cortado e estocado em tubos do tipo *Eppendorfs* a -80°C . As amostras foram colocadas em 35ul de solução de lise (Mammalian Protein Extraction Buffer, GE HealthCare Life Science®) acrescida de um inibidor de proteases e homogeneizados utilizando em esferas no tissue lyser. As amostras foram mantidas em gelo durante todo o procedimento. Os tecidos foram levados a uma centrífuga refrigeradas e submetidos à centrifugação (10.000 RPM), a zero grau (4°C), por 10 minutos. Utilizou-se o método fotolorimétrico de Bradford na leitora de microplacas (Thermo Varioskan®) para análise da concentração de proteína, permitindo que cada banda do gel corresse com a mesma quantidade. As amostras foram acrescidas ao tampão Laemmli (Laemmli Sample Buffer, BIORAD® + 2-Mercaptoetanol, Sigma-Aldrich® [BME], diluídos conforme recomendado pelo fabricante) na proporção de 1:1 e levadas para o banho seco (100°C por 5 minutos). A desnaturação proteica possibilita uma maior ligação entre a proteína e o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS), o que permite a criação de um composto de carga negativa, facilitando assim a identificação da proteína de interesse. As amostras foram pipetadas no gel de poli(acrilamida). Utilizou-se equipamento BIO RAD PowerPAC HC™ (100V; 3,0A, 300W, por 4 horas). Por se tratar de uma proteína de baixo peso molecular (25-8kDa), optamos por um gel de concentração 15% (testes realizados com géis mais concentrados como os de 18 e 20% não demonstrou resultado satisfatório). Concluída a corrida, o gel foi devidamente preparado para transferência em membrana de nitrocelulose. Utilizou-se o método semi-seco para este fim. (Bio Rad, Trans-Blot® Turbo™, seguindo protocolo para baixo peso molecular, 25V por 30min). Para confirmar a transferência das proteínas de baixo peso molecular, após a transferência, realizou-se a coloração dos géis com azul brilhante de Coomassie, R250. As membranas foram acrescidas com anticorpos primários anti-SP-B (Santa Cruz Biotechnology, SP-B Antibody (F-2): sc-133143, na diluição de 1:1000) e deixados sob agitação contínua (com ajuda de um shaker) em ambiente refrigerado (4°C) durante 12 horas *overnight*). Em seguida as membranas foram lavadas com TBST (Tampão [50mM] – Salina [150mM NaCl, pH7.5]

- Tris - Tween® 20 [1% Tween-20]) seguindo-se um protocolo de 3 lavagens, de 10 minutos de duração cada, antes de submeter as membranas ao anticorpo secundário. Posteriormente, acrescentou-se anticorpo secundário anti-camundongo na concentração de 1:10.000. Estas membranas ficaram expostas a este segundo anticorpo por 1 hora, quando foram lavadas seguindo-se o mesmo protocolo de lavagem para remoção do anticorpo primário. Para a detecção, em seguida da ligação do anticorpo secundário, foi adicionada uma solução de ECL (marca®), que, através da reação com a peroxidase do anticorpo secundário, produziu uma resposta de quimioluminescente, permitindo a identificação de bandas referentes à marcação de proteínas específicas ao anticorpo primário. As bandas foram visualizadas e as imagens captadas utilizando o sistema de foto documentador ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad®). As análises foram realizadas em triplicatas por diferentes pesquisadores.

Figura 4- Ilustração do processo para detecção de proteína por *Western Blotting*.



Fonte: Autora, 2024.

4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR

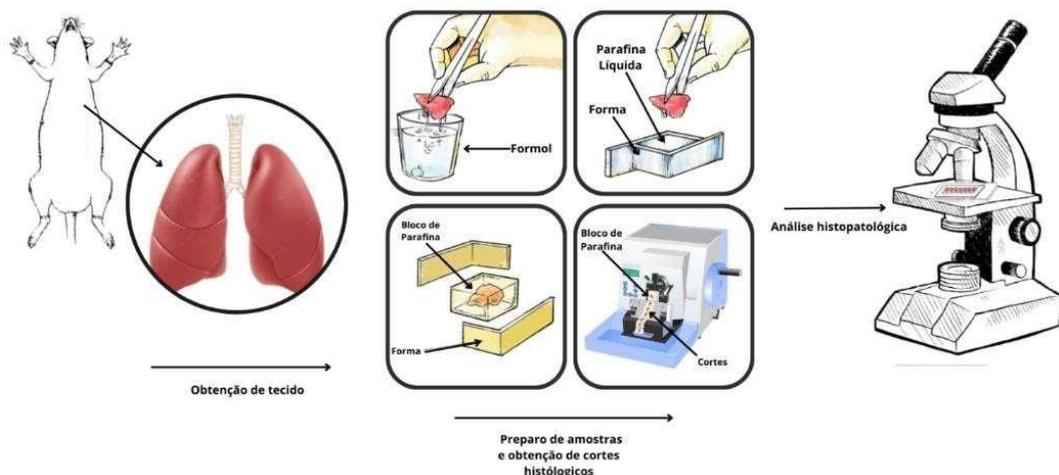
Foi realizada a retirada do pulmão de ratos *Wistar* com sepse submetidos a diferentes tratamentos. Partes de cada pulmão conforme o grupo experimental foram imediatamente acondicionadas em recipientes contendo fixador por 24 horas (formol tamponado a 10%). Em seguida, as amostras foram enviadas para o Laboratório de Histotécnica do Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional, onde foi realizado o processamento histológico. Os órgãos foram incluídos em parafina e cortes de 5µm de espessura foram obtidos com o uso de um micrótomo. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e as preparações histológicas foram

montadas com *Entellan*[®], sendo posteriormente observadas por meio de microscopia de luz para a análise histopatológica. A análise histopatológica foi realizada utilizando microscópio óptico *Zeiss Primo Star*[®] seguida da captura das imagens com câmera *AxioCam Erc5s Zeiss*[®] e para a morfometria foi utilizado programa computacional *AxioVision Release 4.8.2 SP3*.

4.5 MORFOMETRIA

As análises foram realizadas por um observador cego para os protocolos experimentais. O analisador fez a varredura padronizada em todas as lâminas, que representaram os grupos experimentais, totalizando uma área de 28,080mm²/lâmina (obtida por meio de seis campos observacionais de 4,68mm²/cada). Na área estudada foi quantificado: número de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), número de pneumócitos do tipo II, número de alveos pulmonares, área dos alvéolos e espessura dos septos alveolares (Figura 5).

Figura 5- Ilustração do processamento histológico para obtenção de lâminas.



Fonte: Autora, 2024.

4.6 ANÁLISE HEMATOLÓGICAS

As amostras de sangue foram provenientes dos grupos SHAM, CLP, CLP+ATO, CLP+ATB e CLP+ATB+ATO sob plano anestésico com cetamina (100mg/kg) e xilazina (15mg/kg) via intramuscular. Foram coletados 1,5mL de sangue a partir do plexo retro orbital (distribuídos em tubo do tipo *Eppendorf* de 2ml contendo heparina) para a dosagem dos índices hematológicos. O material foi encaminhado ao Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolitos no Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco para processamento e análise utilizando o aparelho automatizado SDH-20 VET (Labtest, Brasil). (Lima, 2018).

Os parâmetros hematológicos analisados foram: contagem leucocitária (WBC), linfócitos (LYM), Granulócitos (GRAN), hemoglobina (HGB), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração hemoglobina corpuscular média (MCHC), contagem total de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (MCV), hematócrito (HCT), parâmetro da variabilidade de tamanho dos eritrócitos (RDW), plaquetas (PLT) e volume plaquetário médio (MPV).

4.7 SCORE FUNCIONAL

Os animais foram acompanhados durante 5 (cinco) dias após as intervenções. As características funcionais foram pontuadas da seguinte forma: alerta (nota: 1 normais; 2 baixa atenção; 3 atenção muito baixa), mobilidade (grau: 1 normal; 2 movimento baixo; 3 imóvel), piloereção (grau: 0 nenhum; 1 piloereção leve; 2 moderado piloereção; 3 piloereção grave), diarreia (nota: 0 nenhuma; 1 moderado; 2 diarreia grave). A soma dessas pontuações determinadas o escore funcional geral (Nakagawa *et al.*, 2007).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores são expressos como média \pm desvio de erro padrão. Teste de normalidade ANOVA *one-way* seguido do *Pos-teste* de *Tukey*. O software *GraphPad*

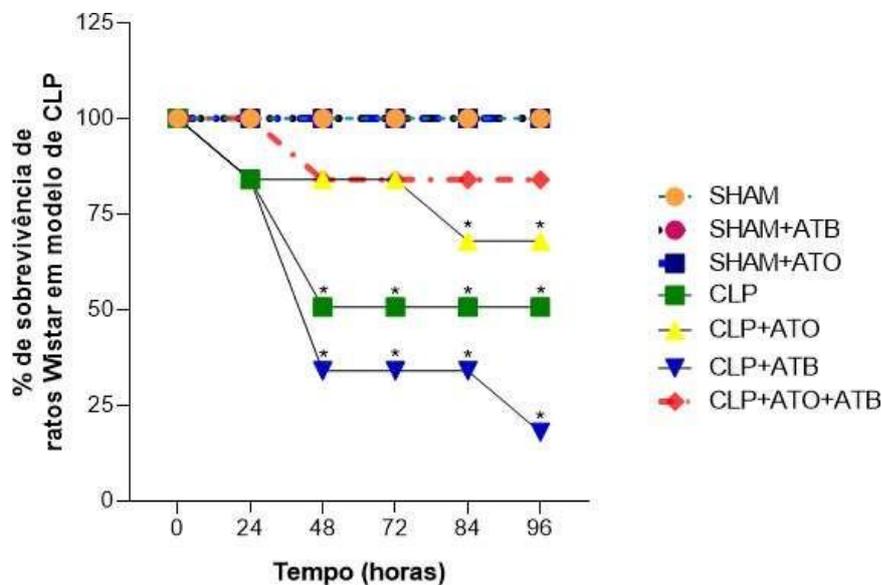
Prism 8.0.2 foi utilizado para análise dos dados onde os mesmos foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 QUANTIFICAÇÃO DO INDICIE DE MORTALIDADE DOS ANIMAIS SÉPTICOS

O percentual de mortalidade experimental do grupo séptico foi de 21,42% o que possibilitou dar continuidade aos grupos com n=6. O índice de sobrevivência dos grupos CLP variaram significativamente ($P<0,05$) de acordo com o tipo de tratamento e o tempo de observação: CLP+AD (48h - 50,67%; 72h - 50,67%; 84h - 50,67% e 96h - 50,67%); CLP+ATO (84h - 68% e 96h - 68%); CLP+ATB (48h - 34%; 72h - 34%; 84h - 34% e 96h - 18%) quando comparados ao grupo SHAM+AD nos mesmos tempos. O CLP+ATB+ATO não apresentou diferença significativa nos tempos em comparação ao SHAM+AD tendo como percentual de sobrevida no tempo de 48h-84% mantendo-se até o final dos cinco dias. Os resultados acima podem ser observados na figura 6.

Figura 6: Sobrevivência de ratos Wistar em modelo de sepse experimental.



Legenda: Grupos controle sem tratamento SHAM e tratados com antioxidante (ATO) ou antibiótico (ATB). Grupo séptico sem tratamento CLP e tratados com ATO ou ATB e ATB+ATO. Análise de variância (ANOVA) por duas vias seguida de Teste de múltipla comparação de Tukey's. Cada grupo experimental foi comparado com o grupo SHAM *($p<0,05$).

5.2 AVALIAÇÃO DA CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

Quanto as características fisiológicas, os animais sépticos tratados com ATO ou ATB+ATO apresentaram melhora significativa ($p < 0,05$) na condição de diarreia, piloereção, mobilidade e letargia comparado ao grupo CLP+AD. Os animais sépticos tratados com ATB+ATO não apresentou diferença significativas quando comparado com os animais SHAM+AD nas seguintes condições: mobilidade e letargia. A soma das pontuações obtidas resultou em um escore funcional de 10 para animais em condições sépticas graves e 2 para animais em condições normais (Tabela 1).

Tabela 1: Características das condições fisiológicas verificadas no decorrer de cinco dias, a partir da indução da sepse e durante o tratamento dos ratos *Wistar* com: ATO, ATB, ATB+ATO ou CLP+AD e controle SHAM+AD.

	SHAM	CLP	CLP+ATO	CLP+ATB	CLP+ATB+ATO
DIARRÉIA	0,0 ± 0,0 ^a	1,83 ± 0,16 ^b	1,0 ± 0,0 ^c	1,5 ± 0,22 ^d	1,0 ± 0,0 ^c
PILOEREÇÃO	0,0 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,22 ^b	2,0 ± 0,0 ^c	2,0 ± 0,0 ^c	2,0 ± 0,0 ^c
MOBILIDADE	1,0 ± 0,0 ^a	3,0 ± 0,0 ^b	2,0 ± 0,0 ^c	2,16 ± 0,16 ^d	1,0 ± 0,0 ^a
LETARGIA	1,0 ± 0,0 ^a	2,66 ± 0,21 ^b	2,0 ± 0,0 ^c	2,0 ± 0,44 ^c	1,0 ± 0,0 ^a
ESCORE	2,0 ± 0,0 ^a	10,00 ± 0,36 ^b	7,0 ± 0,0 ^c	7,66 ± 0,49 ^c	5,0 ± 0,0 ^d

Grupos experimentais (n= 6 animais/por grupo) para caracterizar condições fisiológicas verificadas no decorrer de cinco dias da indução da sepse e tratamento dos ratos *Wistar* quanto as seguintes características fisiológicas de acordo com score estabelecido: alerta (nota: 1, normais; 2, baixa atenção; 3, atenção muito baixa), mobilidade (nota: 1, normal; 2, movimento baixo; 3, imóvel), piloereção (0 = nenhum; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = grave), diarreia (0 = nenhuma; 1 = moderado; 2 = grave). O somatório dessas pontuações determina o score funcional geral. *Análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido de Teste de múltipla comparação de *Tukey's* entre os grupos. Letras minúsculas diferentes, nas linhas, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Na avaliação hematológica, a contagem de plaquetas ($10^3/dl$) se apresentou reduzidas significativamente ($P < 0,05$) no grupo CLP+AD ($141,33 \pm 11,2$) ou ATB ($331,33 \pm 131$), desta forma entende-se que o tratamento isoladamente com ATB tem uma tendencia a diminuir as plaquetas, entretanto observa-se aumento dessas plaquetas no grupo ATO. Essa diminuição não foi verificada nos grupos CLP+ATB+ATO ($437,33 \pm 97,88$) quando comparados ou SHAM+AD (429 ± 69) (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros hematológicos de ratos Wistar séptico (CLP) e sépticos tratados com ATO; ATB ou ATB+ATO, comparados ao grupo controle SHAM+AD.

	SHAM+AD	CLP+AD	CLP+ATO	CLP+ATB	CLP+ATO+ATB
WBC (10 ⁹ /L)	9,5 ±0,86	7,06±0,39	9,43±5,75	7,23±1,32	8,86 ± 1,34
LYM (10 ⁹ /L)	7,73±0,63	3,96 ±0,13	6,4±4,30	6,1±1,20	5,73±0,56
GRAN (10 ⁹ /L)	1,06±0,17	2,1±0,30	1,87±0,86	0,73±0,22	2,4± 0,70
HGB(g/dL)	13,9±0,15	15,13± 0,25	13,2±1,04	12,53±0,65	12,76±0,34
MCH (pg)	19,53±0,19	25,1± 1,85	30,33±16,86	19,73±0,11	20,26±0,17
MCHC(g/d)	34,56±0,07	37,93±1,07	45,67±19,18	34,83±0,33	34,86±0,36
RBC (10 ⁶ /L)	7,12±0,02	6,22±0,33	5,23±2,35	6,36±0,30	6,31±0,14
MCV (fl)	57,5±0,69	65,53± 3	64,2±8,07	56,7±0,89	58,16±0,49
HCT (%)	40,4± 0,50	39,96±0,44	32,3±11,98	36,26±2,15	36,8±1,11
RDW (%)	13,23±0,15	19,83± 2,03	18,93±8,84	12,76±0,27	13,5±0,26
PLT (10 ³ /l)	429± 241,89 ^a	141,33±38,79 ^b	627±87,72 ^c	331,33±13 ^d	437,33± 339,08 ^a
MPV (fl)	6,7± 0,27	7,03±0,14	6,1±0,17	7,7±0,53	6,46±0,08

Grupo experimental (n= 3animais/por grupo) para determinação dos níveis de Leucócitos (WBC); Linfócitos (LYM); Granulócitos (GRAN); Hemoglobina (HGB); Hemoglobina corpuscular média (MCH); Concentração da Hemoglobina Corpuscular média (MCHC); Contagem total de glóbulos vermelhos (RBC); Volume Corpuscular Médio(MVC);Hematócrito(HCT); Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelho (red cell distribution width -RDW); Plaquetas (PLT); volume plaquetário médio (MPV).*Análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido de Teste de múltipla comparação de *Tukey's* entre os grupos. Letras minúsculas diferentes, nas linhas, diferem estatisticamente (p<0,05).

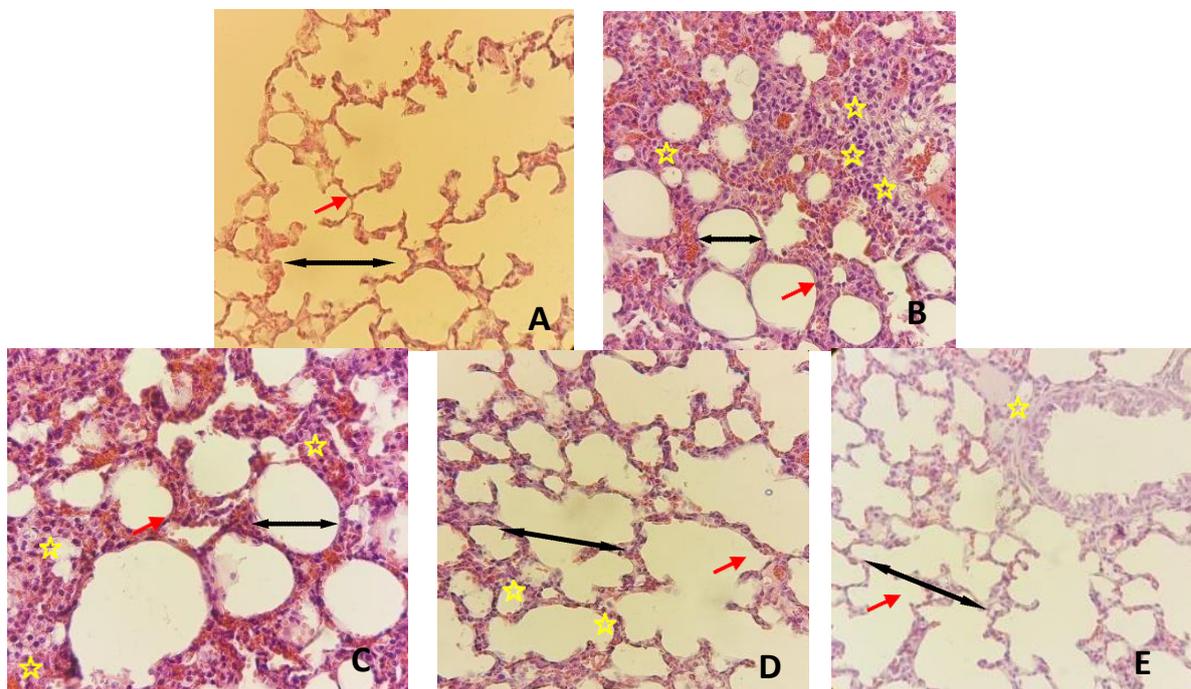
5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR

Foram observados na análise histológica a estrutura pulmonar de animais controle positivo SHAM e sépticos CLP tratados com ATO; ATB ou ATO+ATB. No grupo SHAM observam-se bronquíolos sem a presença de cartilagem nas paredes, presença de pequeno ramo da artéria pulmonar e vasta rede de alvéolos, alvéolos separados por delicados septos apresentando morfologia normal (Figura 7A). Nos animais sépticos CLP observam-se septos espessos (presença de edema) com vasodilatação (aumento do volume de sangue no tecido) e infiltração linfocitária. Os alvéolos apresentam-se dispersos em um parênquima pulmonar compacto, apresentando desorganização da arquitetura alveolar (Figura 7 B).

Quanto aos animais sépticos tratados com ATB verifica-se alvéolos aparentemente inflados e septos alveolares congestionados/turgidos. Os alvéolos apresentam-se dispersos em um parênquima pulmonar bastante infiltrado com

linfócitos (Figura 7 C). O grupo de animais tratado com ATO observam-se em algumas áreas rede de alvéolos íntegros com septos delgados (septos finos) e menor infiltração de células (Figura 7 D). No grupo de animais sépticos tratados com ATO+ATB. Observa-se maior concentração de alvéolos contendo ar no seu interior, e septos alveolares delgados e estrutura pulmonar preservada (Figura 7 E).

Figura 7- Tecido pulmonar de ratos *Wistar* controle (SHAM, Fig. 7A); sépticos sem tratamento (CLP, Fig. 7B); tratados com: antibiótico (ATB, Fig. 7C); associação de vitaminas e antioxidante (ATO, Fig. 7D); associação de antibiótico, vitaminas e antioxidante (ATB+ATO, Fig. 7E).

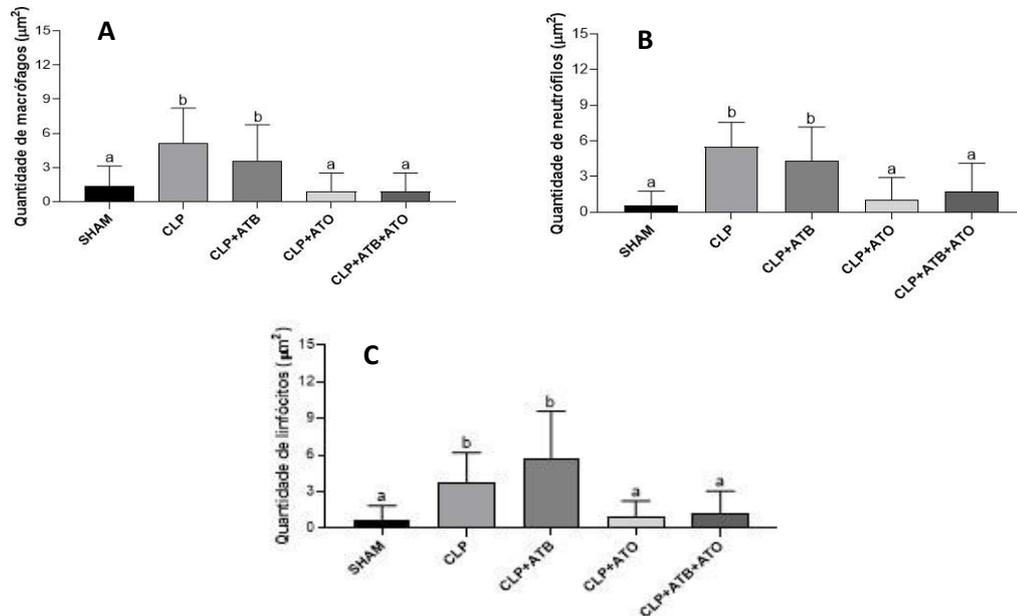


Legenda: Fotomicrografia do tecido pulmonar de ratos *Wistar* corado com Hematoxilina e Eosina. magnificação 400x. Seta vermelha indicando os septos alveolares; estrelas amarelas indicando células inflamatórias; setas pretas indicam os sacos alveolares.

5.5 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO PULMÃO DE RATOS *WISTAR* SÉPTICOS

Quanto a histomorfometria verificou-se que a infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar dos animais tratados com ATO ou ATB+ATO não apresentaram diferença significativa comparado ao grupo SHAM, por outro lado os animais tratados com CLP ou ATB apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) de células inflamatórias em comparação ao observado no SHAM (Figura 8A; 8B e 8C).

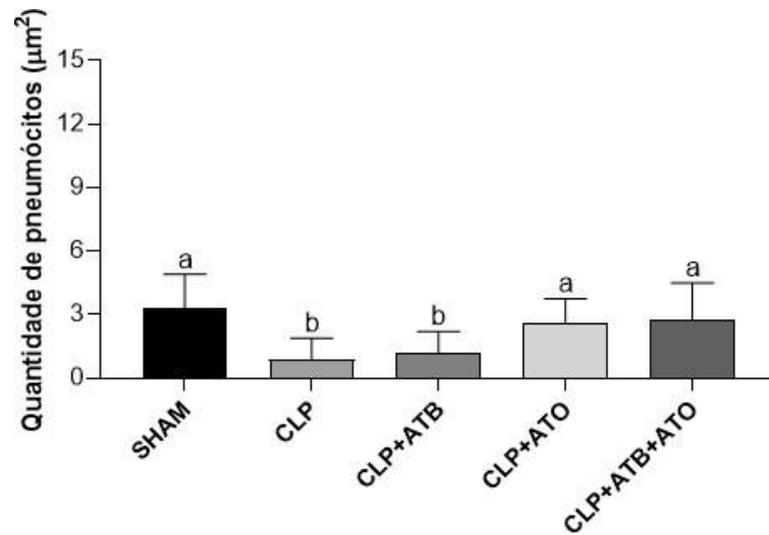
Figura 8- Quantificação de macrófago (A), neutrófilo (B) e linfócito (C) em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados.



Legenda: Quantificação de neutrófilos (A), linfócitos (B) e macrófagos (C) em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados com: Ceftriaxona (30mg/kg; i.p.) - ATB; antioxidantes i.p. (ácido ascórbico - 50mg/kg; N-acetilcisteína - 10mg/kg; alfa tocoferol - 20mg/kg) - ATO ou associação de antioxidantes i.p. (ácido ascórbico - 50mg/kg; N-acetilcisteína - 10mg/kg; alfa tocoferol - 20mg/kg) + Ceftriaxona (30mg/kg; i.p.) - ATO+ATB comparados entre si, ao aos grupos controle: SHAM (água destilado (AD) 5ml/kg; i.p.) ou grupo séptico (CLP) (água destilado (AD) 5ml/kg; i.p.). Letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente (P<0,05).

Em relação ao número de pneumócitos tipo II os grupos tratados com ATO ou ATB+ATO não apresentaram diferença significativa comparado ao SHAM. Entretanto, o tratado com ATB isoladamente reduziu significativamente a quantidade de pneumócitos tipo II neste grupo comparado a de todos os outros (Figura: 9).

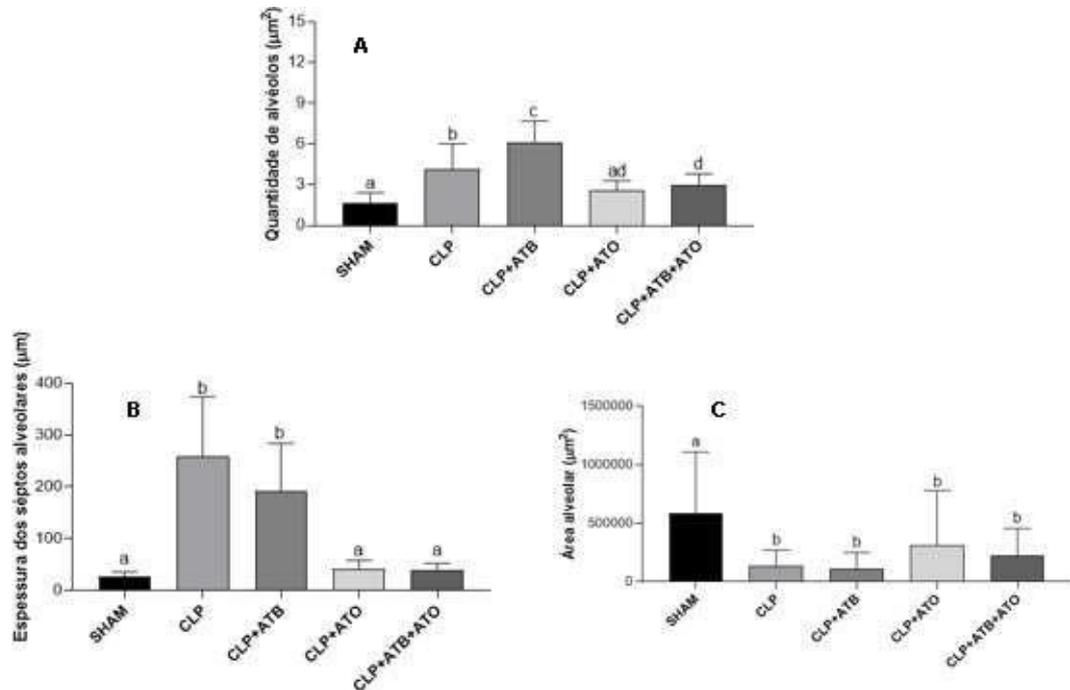
Figura 9 - Quantificação de pneumócitos tipo II em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados.



Legenda: Quantificação de pneumócitos tipo II em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados com: Ceftriaxona (30mg/kg; i.p.) - ATB; antioxidantes i.p. (ácido ascórbico - 50mg/kg; N-acetilcisteína - 10mg/kg; alfa tocoferol - 20mg/kg) - ATO ou associação de antioxidantes i.p. (ácido ascórbico - 50mg/kg; N-acetilcisteína - 10mg/kg; alfa tocoferol - 20mg/kg) + Ceftriaxona (30mg/kg; i.p.) - ATO+ATB comparados entre si, aos grupos controle: SHAM (água destilado (AD) 5ml/kg; i.p.) ou grupo séptico (CLP) (água destilado (AD) 5ml/kg; i.p.). Letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

A quantidade alveolar nos animais sépticos tratados com ATO isoladamente foi semelhante àquelas verificadas no grupo SHAM e CLP+ATB+ATO. Os animais sépticos tratados com ATB apresentaram maior quantidade de alvéolos, porém com menor área alveolar em relação aos demais grupos. Por sua vez, a área alveolar nos grupos sépticos tratados com ATB; ATO ou ATB+ATO exibem significativamente menor área comparado ao SHAM+AD. No que se refere a espessura dos septos alveolares dos animais tratados com ATO ou ATB+ATO, esses se mostraram semelhantes ao SHAM. Fato não verificado nos animais sépticos e tratados com ATB isoladamente os quais apresentaram espessura dos septos maior que os aquelas verificadas nos animais tratados com ATO ou ATO+ATB (Figura 10A, 10B, 10C).

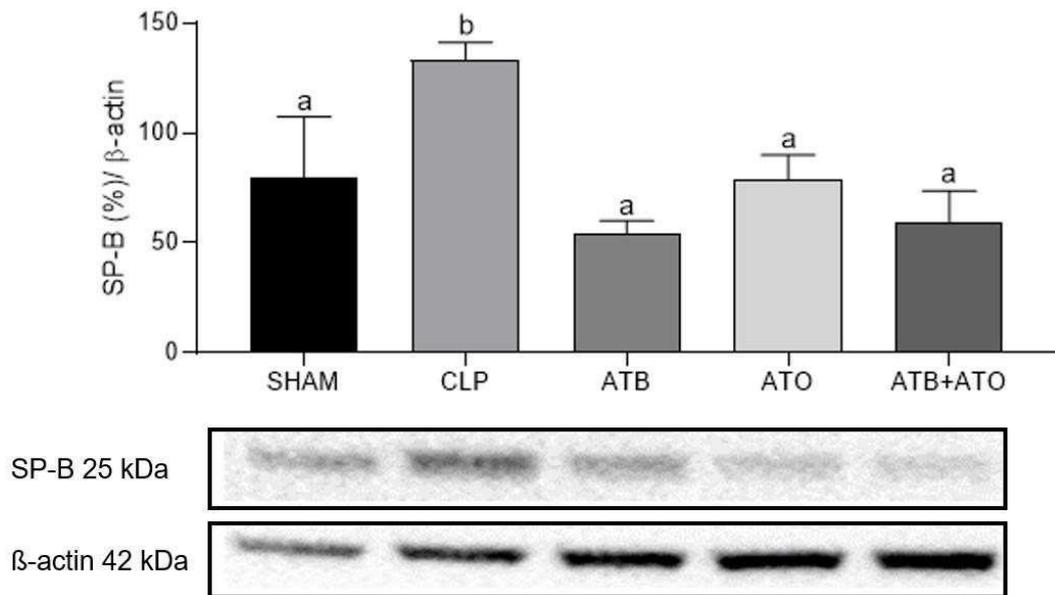
Figura 10- Quantificação de alvéolos pulmonares (A) espessura dos septos alveolares (B) e da determinação da área alveolar (C) em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados.



Legenda: Quantificação de alvéolos pulmonares (A) determinação da área alveolar (B) e da espessura dos septos alveolares (C) em tecido pulmonar de Ratos Wistar com sepse tratados com: Ceftriaxona (30mg/kg; i.p.) - ATB; antioxidantes i.p. (ácido ascórbico - 50mg/kg; N-acetilcisteína - 10mg/kg; alfa tocoferol - 20mg/kg) - ATO ou associação de antioxidantes i.p. (ácido ascórbico - 50mg/kg; N-acetilcisteína - 10mg/kg; alfa tocoferol - 20mg/kg) + Ceftriaxona (30mg/kg; i.p.) - ATO+ATB comparados entre si, ao aos grupos controle: SHAM (água destilado (AD) 5ml/kg; i.p.) ou grupo séptico (CLP) (água destilado (AD) 5ml/kg; i.p.). Letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

As análises foram realizadas em triplicatas por diferentes pesquisadores, obtendo os mesmos resultados. A proteína surfactante pulmonar tipo B foi expressa nas amostras conforme mostrado na figura 11. A detecção de proteína por Western blot mostrou que o nível da surfactante tipo B nos tecidos de ratos Wistar sépticos apresentam-se maior significativamente ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo SHAM. Por outro lado, essa diferença não foi observada entre os respectivos tratamentos com ATB, ATO ou ATB+ATO quando comparado ao controle SHAM.

Figura 11- Quantificação de proteína surfactante tipo B em pulmão de ratos Wistar hígdios (SHAM) e sépticos (CLP) tratados com antibiótico (ATB), antioxidantes (ATO) ou antibiótico mais antioxidante (ATB+ATO).



Legenda: determinação de proteína surfactante pulmonar em ratos *Wistar* sépticos (CLP) e tratados com antibiótico (ATB), antioxidante (ATO) ou antioxidante mais antibiótico (ATB+ATO) comparados entre si, ao grupos controle (SHAM). Letras minúsculas diferentes, indicam significância estatística (P<0,05).

6 DISCUSSÃO

Neste presente estudo os resultados demonstram que os ratos *Wistar* tratados com ATO ou ATO+ATB obtiveram maior taxa de sobrevivência, melhorando também as características de condições fisiológicas. Isto, pode-se dar a presença de antioxidante que por sua vez mimetizam a inflamação sistêmica causadas por radicais livres produzidos por leucócitos. As espécies reativas de oxigênio desempenham papel importante na patogênese da LPA, uma vez que propagam dano celular e iniciam resposta pró-inflamatória (Zhao *et al.*, 2020; Sulzbacher *et al.*, 2020).

De acordo El-Megharbel *et al.*, (2022), a ceftriaxona está relacionada com o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), marcador final de peroxidação lipídica (MDA) e redução dos níveis de enzimas antioxidantes. Por tanto, se em um tecido ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio esse fator pode dar origem a uma lesão tecidual e conseqüentemente propiciando o surgimento do ciclo inflamatório. Este achado corrobora com o nosso resultado, onde o tratamento ATB apresentaram maior taxa de mortalidade 18%, apresentando também maior comprometimento das condições fisiológicas. Com tudo segundo Lai *et al.*, (2020), a utilização do antibiótico se faz necessário para o controle das afecções de cunho bacteriano.

Estudos clínicos mostram que os antioxidantes reduzem a disfunção dos macrófagos hiperoxidados que liberam a (HMGB-1). A HMGB-1 é uma proteína com perfil de marcador inflamatório, considerada como DAMP, onde, nos pulmões, elevados níveis mediam a lesão pulmonar aguda (LPA). Por sua vez, a vitamina C pode minimizar os sinais da LPA por melhorar a função dos macrófagos no que concerne o processo de fagocitose e por atenuar o acúmulo extracelular de HMGB1, justificando assim a sua utilização no tratamento em lesão pulmonar aguda induzida pelo estresse oxidativo (Patel *et al.*, 2020).

Referente a análise hematológica verificou-se, que o grupo ATB apresentou redução de plaquetas que pode por sua vez, está atrelada a distúrbios de coagulação. Segundo Ghimire *et al.*, (2021), na sepse a ocorrência de distúrbios de coagulação, está relacionada com a presença de trombocitopenia, a qual é uma alteração comumente detectada durante um quadro de sepse. Essa redução plaquetária pode

ser decorrente da diminuição na produção, aumento do consumo, destruição ou sequestro plaquetário. Esses mesmos autores, reportam que as plaquetas desempenham papel essencial na hemostasia, podendo ser utilizadas como marcadores de coagulação intravascular, o qual, quando reduzido, apresenta importante ameaça à sobrevivência do paciente.

Os resultados apresentados demonstram que os antioxidantes (vitamina C, vitamina E e N-acetilcisteína) isoladamente ou associados com o ATB reduziram os danos no tecido pulmonar decorrente da lesão provocada pela sepse. Segundo Varela, (2019), o tratamento paralelo com antibiótico e antioxidante mostrou melhor efeito protetor de danos no parênquima pulmonar, preservando sua estrutura, com seu resultado confirmou a ação protetora dos antioxidantes na LPA. Pode-se justificar esta ação protetora dos antioxidantes por contribuir na redução do efeito de ERs geradas por células leucocitárias como macrófago e neutrófilos, que na sepse são principais fontes de espécies reativas de O₂.

Essas evidências corroboram nossos achados, quanto a redução das células inflamatórias, preservação de estruturas alveolares e presença de pneumócitos tipo II nos grupos que receberam ATO ou ATB+ATO como tratamento, e a partir desses resultados pode-se sugerir que a redução da migração de células inflamatórias para o tecido pulmonar, possivelmente mediada pela presença do ATO, favorece a redução da injúria tecidual e conseqüentemente o agravamento da LPA.

O aumento dos níveis da proteína surfactante tipo B está atrelada a lesão de pneumócitos tipo II, podendo ser utilizada para classificar pacientes como de alto ou baixo risco de progressão para a LPA ou morte. Embora as proteínas surfactantes sejam normalmente encontradas apenas em quantidades apreciáveis no pulmão, vazamento de proteína surfactante-B (SP-B) na circulação foi relatado em vários distúrbios respiratórios, sendo considerada um indicador da gravidade da lesão pulmonar (Andrew *et al.*, 2000; Ian *et al.*, 1997). Estudos de marcação em pneumócitos tipo II sugerem que a proteína é secretada no alvéolo como pró-proteína monomérica hidrofílica e intermediário 42 kDa e 25 kDa, respectivamente. Em sua forma imunorreativa a SP-B é consideravelmente pequena capaz de ultrapassar a barreira alvéolo-capilar atingindo a corrente sanguínea (Weaver, 1989), a SP-B ainda foi altamente expressa no lavado broncoalveolar após indução de lesão pulmonar por

hiperóxia em modelo animal (Liu *et al.*, 2018). Os nossos resultados sugerem que a sepse induz lesão alveolar promovendo ruptura celular e como consequência liberação do conteúdo presente nas organelas e no citoplasma.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, os antioxidantes (vitamina C, vitamina E ou N-acetilcisteína) quando administrados por via intraperitoneal, em modelo animal de sepse, associados ou não a um antibiótico, promove a conservação das estruturas histológicas presentes na matriz pulmonar mesmo quando submetidos as injúrias decorrentes desse quadro infeccioso, e aumenta a sobrevida dos animais que receberam esses tratamentos. A expressão da proteína surfactante pulmonar tipo B pode ser utilizada como marcador da lesão pulmonar aguda decorrente da sepse, fornecendo informações de prognóstico sobre o declínio funcional pulmonar.

REFERÊNCIAS

- AMMAR, M. A. *et al.* Vitamin C for Sepsis and Septic Shock. **American Journal of Therapeutics**, v. 28, p. 649-679, 2021.
- BARICHELLO, T. *et al.* Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. **Critical Care**, v. 26, p. 14, 2022.
- BERNARDO, L. R. **Avaliação do mecanismo de ação da milonina no modelo murino de lesão pulmonar aguda e estudos in silico**. 2022. 118 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba.
- BRANDT, J. P. & MANDIGA, P. Histology, alveolar cells. 2020. **Bula do Ceftriaxona**, 2020. Disponível em:<<https://consultaremedios.com.br/ceftriaxona/bula>>. Acesso em: 22.04.2023.
- CARTEADO, L.R. Resumo de Ceftriaxona. **Sanar**, 2020. Disponível em:<<https://www.sanarmed.com/resumo-de-ceftriaxona-ligas>>. Acesso em: 02 de maio de 2022.
- CARVALHO, L. M. G. **Efeito da riboflavina sobre a pele de ratos irradiados com UV-A**. 2021. f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CARVALLO, F. R. & STEVENSON, V. B. Interstitial pneumonia and diffuse alveolar damage in domestic animals. **Veterinary Pathology**, v. 59, p. 586-601, 2022.
- CALABRETTA, E. *et al.* Endotelite induzida por COVID-19: evidências emergentes e possíveis estratégias terapêuticas. **British Journal of Hematology**, v. 193,p. 43-51, 2021.
- CASTILLO-SÁNCHEZ, J. C. *et al.* Structural hallmarks of lung surfactant: Lipid-protein interactions, membrane structure and future challenges. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 703, p. 108850, 2021.
- DA ROSA STEINER, H. **Elaboração de guia prático de antimicrobianos para consulta rápida do tratamento empírico de infecções bacterianas em adultos**. 2022. 34 f. Trabalho de Conclusão (Residência). Universidade Federal de Santa Catarina.
- DANTAS, E.P. V. *et al.* Fotobiomodulação como coadjuvante no tratamento na lesão pulmonar aguda decorrente da sepse. **Research, Society and Development**, v. 9, p. e5929109024-e5929109024, 2020.
- DENNING, N. *et al.* DAMPs and NETs in sepsis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2536, 2019.
- DOLMATOVA, E. V. *et al.* The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. **Cardiovascular research**, v. 117, p. 60-73, 2021.

DUCEAC, L. D. *et al.* Third-generation cephalosporin-loaded chitosan used to limit microorganisms resistance. **Materials**, v. 13, p. 4792, 2020.

EL-MEGHARBEL, S.M. *et al.* Synthesis, Spectroscopic Studies for Five New Mg (II), Fe (III), Cu (II), Zn (II) and Se (IV) Ceftriaxone Antibiotic Drug Complexes and Their Possible Hepatoprotective and Antioxidant Capacities. **Antibiotics**, v. 11, p. 547, 2022.

EMS. **Superioridade de espectro de ação das cefalosporinas de segunda geração x primeira geração**, 2020. Disponível em:

https://medicoexponencialems.com.br/skin/antibiotico/assets/files/EMS_0010_21_V2_CEFALOSPORINA.pdf?v=2. Acesso em 22.04 de 2023.

FIOCRUZ, 2021. **Sepse: a maior causa de morte nas UTIs**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/sepse-maior-causa-de-morte-nas-utis>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2022.

FONT, M. D. *et al.* Sepsis and Septic Shock-Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. **Medical Clinics**, v. 104, p. 573-585, 2020.

GAUER, R. *et al.* Sepsis: diagnosis and management. **American family physician**, v. 101, p. 409-418, 2020.

GHIMIRE, S. *et al.* Current understanding and future implications of sepsis-induced thrombocytopenia. **European journal of haematology**, v. 106, p. 301-305, 2021.

GHATI, A. *et al.* Exogenous pulmonary surfactant: A review focused on adjunctive therapy for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 including SP-A and SP-D as added clinical marker. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 51, p. 101413, 2021.

GUPTA, Anjali *et al.* Pulmonary Surfactants: Development and Respiratory Physiology. **Surfactants from Renewable Raw Materials**, p. 201-210, 2021.

GUZMÁN, E. & SANTINI, E. Lung surfactant-particles at fluid interfaces for toxicity assessments. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 39, p. 24-39, 2019.

HE, Y. *et al.* Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105224, 2021.

HOLFORD, P. *et al.* Vitamin C—An adjunctive therapy for respiratory infection, sepsis and COVID-19. **Nutrients**, v. 12, p. 3760, 2020.

HUANG, M. *et al.* The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets. **International journal of molecular sciences**, v. 20, p. 5376, 2019.

JOHANSSON, J. & CURSTEDT, T. Synthetic surfactants with SP-B and SP-C analogues to enable worldwide treatment of neonatal respiratory distress syndrome and other lung diseases. **Journal of internal medicine**, v. 285, p. 165-186, 2019.

KLIGERMAN, S. Pathogenesis, Imaging, and Evolution of Acute Lung Injury. **Radiologic Clinics**, v. 60, p. 925-939, 2022.

LAI, Chih-Cheng; WANG, Cheng-Yi; HSUEH, Po-Ren. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, p. 505-512, 2020.

LI, R. *et al.* Therapeutic targets and signaling mechanisms of vitamin C activity against sepsis: a bioinformatics study. **Briefings in bioinformatics**, v. 22, p. 079, 2021.

LIMA, F. E. G. **Perfil bioquímico e hematológico de ratos e camundongos do biotério central da Universidade Federal do Ceará**. 2018. 76 f. Trabalho de Dissertação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LIMA JÚNIOR, J. G. S. *et al.* Características epidemiológicas da sepse nas unidades de saúde pública no BRASIL entre os anos de 2018 e 2021: impacto da pandemia de covid-19. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102090, 2022.

LIU, P. *et al.* Ferrostatin-1 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting ferroptosis. **Cellular & molecular biology letters**, v. 25, p. 1-14, 2020.

LIU, Q. *et al.* Physicochemical properties of nanoparticles affecting their fate and the physiological function of pulmonary surfactants. **Acta biomaterialia**, v. 140, p. 76-87, 2022.

MAY, C. N. *et al.* Therapeutic potential of megadose vitamin C to reverse organ dysfunction in sepsis and COVID-19. **British journal of pharmacology**, v. 178, p. 3864-3868, 2021.

MIRASTSCHIJSKI, U. *et al.* Lung surfactant for pulmonary barrier restoration in patients with COVID-19 pneumonia. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 254, 2020.

MIOTTI, F. **Interação entre respostas antioxidantes e *Azospirillum brasilense* no milho cultivado sob estresse salino**. 2021. f. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

MUMTAZ, S. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana da vitamina C contra patógenos bacterianos humanos. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

NAKAGAWA, N. K. *et al.* In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control. **Clinics**, v. 62, p. 321-326, 2007.

NASCIMENTO, M. V. O. *et al.* Mecanismos Moleculares da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica em Vigência da Sepse. **InterfaceHS**, v. 14, 2019.

NUR, C. *et al.* Vitamins C and E protect from sepsis-induced lung damage in rat and CT correlation. **Bratislava Medical Journal**, v. 123, 2022.

OLIVEIRA, D.V. **Perspetivas futuras da terapia pediátrica com surfactantes pulmonares: síndrome da dificuldade respiratória.** 2020. 38 f. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa.

OSANAI, K. *et al.* Trafficking of newly synthesized surfactant protein B to the lamellar body in alveolar type II cells. **Cell and tissue research**, v. 381, p. 427-438, 2020.

PARK, I. *et al.* Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. **European Respiratory Journal**, v. 53, 2019.

PATEL, V. *et al.* Dietary antioxidants significantly attenuate hyperoxia-induced acute inflammatory lung injury by enhancing macrophage function via reducing the accumulation of airway HMGB1. **International journal of molecular sciences**, v. 21, p. 977, 2020.

PÉREZ-GIL, J. A recipe for a good clinical pulmonar surfactant. **Biomedical journal**, p. 615-628, 2022.

PIMENTEL, A. S. **Nanopartículas de ouro revestidas com polímeros e nanopartículas poliméricas como nanocarreadoras do peptídeo antimicrobiano BP-100 através de um modelo de surfactante pulmonar.** 2020. f. Dissertação. PUC-Rio.

PLOCHARSKI, M. *et al.* VITAMINA CX SEPSE: UMA LUZ NO FIM DO TÚNEL?. **Revista Uningá**, v. 56, p. 89-94, 2019.

RITTER, C. *et al.* Estratificação para predizer a resposta ao tratamento antioxidante em terapia intensiva: um estudo translacional. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 32, p. 108-114, 2020.

ROBICHAUD, N.A.S *et al.* All-atom molecular dynamics simulations of dimeric lung surfactant protein B in lipid multilayers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 3863, 2019.

SANTOS, M. E. N. *et al.* Estimativa de custos com internações de pacientes vítimas de sepsis: Revisão Integrativa. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 95, 2021.

SANAR. **Resumo de Cefalosporinas**, 2019. Disponível em : <https://www.sanarmed.com/resumo-de-antibioticoterapia-cefalosporinas-yellowbook>. Acesso em: 22.04. 2023.

SILVA, E. *et al.* An adverse outcome pathway for lung surfactant function inhibition leading to decreased lung function. **Current research in toxicology**, v. 2, p. 225-236, 2021.

SILVA, L. C. Terapêutica antioxidante ortomolecular como estratégia para uma saúde equilibrada Orthomolecular antioxidant therapy as a strategy for balanced health. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, p. 16370-16392, 2021.

SULZBACHER, M. M. *et al.* Estresse oxidativo e diminuição de HSP70 tecidual envolvidos na gênese da sepse: HSP70 como alvo terapêutico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 32, p. 585-591, 2020.

SUDIRMAN, T. *et al.* Vitamin E administration as preventive measures for peritoneal/intra-abdominal adhesions: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Medicine and Surgery**, p. 104225, 2022.

TELES, I. S. **Fatores predisponentes de sepse e choque séptico na Oncologia Pediátrica**. 2022. f. Tese de Doutorado. Universidade Iguazu.

VARELA, N. M. T. **Avaliação histopatológica e da expressão da proteína surfactante tipo-B no pulmão de ratos wistar submetidos à sepse**. 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco.

VIANA, R. A. P. P. *et al.* **Sepse: um problema de saúde pública**. 2020. 3ª edição. São Paulo. Instituto Latino-Americano de Sepse-ILAS.

WALTHER, F. J. *et al.* Advances in synthetic lung surfactant protein technology. **Expert review of respiratory medicine**, v. 13, p. 499-501, 2019.

WENCLEWSKA, S. *et al.* Vitamin D supplementation reduces both oxidative DNA damage and insulin resistance in the elderly with metabolic disorders. **International journal of molecular sciences**, v. 20, p. 2891, 2019.

WERTH, B. J. **Cefalosporinas**, 2022. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7asinfeciosas/bact%C3%A9rias-ef%C3%A1rmacosantibacterianos/cefalosporinas>. Acesso em: 22.04 de 2023.

ZANZA, C. *et al.* Oxidative stress in critical care and vitamins supplement therapy: " a beneficial care enhancing". **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 2019, p. 7703-7712, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, p. 407, 2021.

ZHOU, X *et al.* Rules of anti-infection therapy for sepsis and septic shock. **Chinese medical journal**, v. 132, p. 589-596, 2019.

Weaver, TIMOTHY E. & JEFFREY A. Whitsett. "Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells." **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology** v.257, p. L100-L108, 1989.

Liu D, Liu Y, Dou L, Sun M, Jiang H, Yi M. Spatial and temporal expression of SP-B and TGF- β 1 in hyperoxia-induced neonatal rat lung injury. **Int J Clin Exp Pathol.** v.1,p.232-239, 2018.

Andrew d. Bersten, Tamara Hunt , Terrence E. Nicholas , and Ian r. Doyle. Elevated Plasma Surfactant Protein-B Predicts Development of Acute Respiratory Distress Syndrome in Patients with Acute Respiratory Failure. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2000.

Ian r. Doyle , Andrew D. Bersten e Terence e. Nicholas. Surfactant Proteins-A and -B Are Elevated in Plasma of Patients with Acute Respiratory Failure. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 1997.

BÍBLIA. Exemplos da História de Israel. Tradução de João Ferreira de Almeida. 1Coríntios, 10:31, p.1076,2023.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, 570
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 7128 9842
 ceu@ufpe.br

Recife, 02 de maio de 2022

Ofício nº 25/22

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.^a Maria Bernadete de Sousa Maia

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Centro de Biociências

Processo nº 0080/2019

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da co-administração de ceftriaxona e antioxidantes no consumo de oxigênio mitocondrial e expressão das proteínas SP-B e HMGB-1 no pulmão de ratos submetidos à sepse". Registrado com o nº 0080/2019 sob a responsabilidade de Prof.^a Maria Bernadete de Sousa Maia o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/04/2022

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Maio de 2022 a Maio de 2023
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico
Nº de animais	70 animais
Peso/Idade	300-350g/ 2-3 meses
Sexo	Macho (70)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do departamento de Fisiologia e Farmacologia (Laboratório de Farmacologia e Produtos Bioativos - LFPB) da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do departamento de Fisiologia e Farmacologia (Laboratório de Farmacologia e Produtos Bioativos - LFPB) da UFPE.

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345891

ANEXO B- SUBMISSÃO DO ARTIGO

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics

Assessment of antibiotics, vitamins, and antioxidants in the treatment of acute lung injury induced by sepsis in vivo: histomorphometric and molecular aspects

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full length article
Keywords:	Acute Lung Injury; Sepsis; Histology; Morphometry
Corresponding Author:	Eryvelton Franco Federal University of Pernambuco BRAZIL
First Author:	Vera Kaissa Souza Santos Bacelar
Order of Authors:	Vera Kaissa Souza Santos Bacelar Eryvelton Franco, PhD André Martins Galvão, PhD Silvania Tavares Paz, PhD Wyndly Daniel Cardoso Gaião Elifrances Galdino de Oliveira Mario Ribeiro de Melo-Júnior, PhD Dayane Aparecida Gomes, PhD Maria Bernadete de Sousa Maia, PhD
Abstract:	Acute lung injury induced by sepsis is one of the main causes of morbidity and mortality among diseases that affect the respiratory system. This study aimed to assess the therapeutic response of ceftriaxone (ATB), vitamins C and E associated with N-acetylcysteine (ATO), and the combination of ATB + ATO in the treatment of pulmonary sepsis in vivo. The study induced sepsis in 30 male Wistar rats (200-300 g) through cecal ligation and puncture (CLP). They were divided into five different experimental protocols (n = 6 animals/group), beginning intraperitoneal treatment for 5 consecutive days, 24 hours after model induction. At the end of the experiment, lung fragments were collected for histomorphometric evaluation and expression of type B surfactant protein (SP-B) with Western blotting. The groups treated with ATO+ATB or ATO had their lung structures preserved, revealing delicate septa, a greater quantity of type II pneumocytes (PT-II), and less inflammatory infiltration. There was no significant difference in the number of macrophages, lymphocytes, neutrophils, PT-II, or the thickness of the septa between these groups and the SHAM group. Animals treated only with antibiotics had disorganized lung architecture, congested septa, atelectasis, reduced PT-II, and greater inflammatory infiltration, significantly different from the SHAM. The antioxidant had promising results in preserving lung structures and reducing inflammatory cell infiltrations. SP-B expression in the ATO, ATB, and ATO+ATB groups was similar to that in SHAM. It is concluded that the use of antioxidants in the therapeutic protocol to treat acute lung injury resulting from experimental sepsis allows better conservation of the lung parenchyma and maintains SP-B expression in a physiological amount.
Suggested Reviewers:	Gloria Pinto Duarte gloria.duarte@ufpe.br Jaciane Aguiar jaciane.aguiar@ufpe.br